

**Создание клеточных линий с гиперэкспрессией цистатионин- $\beta$ -синтазы человека**

**Научный руководитель – Сольев Павел Николаевич**

**Каверина Александра Павловна**

*Студент (магистр)*

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия

*E-mail: kaverina.a@list.ru*

Цистатионин- $\beta$ -синтаза (CBS; КФ 4.2.1.22) – ключевой фермент транссульфурационного пути биосинтеза, катализирующий PLP-зависимую конденсацию гомоцистеина и серина с образованием цистатионина – промежуточного продукта метаболизма цистеина и метионина. Помимо детоксикации гомоцистеина и обеспечения синтеза цистеина *de novo*, CBS катализирует ещё одну реакцию с выделением одного из основных газотрансмиттеров – сероводорода ( $H_2S$ ). Дисрегуляция активности и экспрессии CBS играет критическую роль в патогенезе широкого спектра заболеваний. Гиперэкспрессия CBS наблюдается при многих солидных опухолях (аденокарцинома легкого, колоректальный рак и др.), способствуя опухолевому прогрессу, в то время как избыточная продукция  $H_2S$  в нейронах усугубляет повреждение при ишемическом инсульте. Несмотря на очевидную значимость CBS как терапевтической мишени, существует дефицит стандартизированных *in vitro* моделей, адекватно воспроизводящих состояние гиперфункции фермента.

Целью данной работы являлось создание и валидация панели стабильных клеточных линий млекопитающих с гиперэкспрессией гена CBS человека для последующего поиска и изучения селективных ингибиторов фермента.

Для моделирования роли CBS в патологии нервной системы были использованы две родственные линии нейробластомы человека: родительская гетерогенная линия SK-N-SH и ее нейробластоподобный субклон SH-SY5Y. Помимо них в панель вошли: линия НЕК293Т (эмбриональная почка) с низким базальным уровнем CBS в качестве контрольной модели; онкологические линии А549 (аденокарцинома лёгкого), НСТ116 (карцинома толстой кишки), SKBR3 (аденокарцинома молочной железы); а также линия Н9с2 (кардиомиобласты крысы) в контексте сердечно-сосудистых заболеваний. Полную кодирующую последовательность гена CBS амплифицировали методом вложенной ПЦР с кДНК, полученной из клеток SH-SY5Y, и клонировали в лентивирусный вектор рL4Puro. Полученной конструкцией рL4Puro-CBS и котрансфицировали клетки НЕК293Т вместе с упаковочными плазмидами для продукции лентивирусных частиц. Трансдукцию целевых клеточных линий проводили в присутствии полибрена с последующей селекцией стабильно экспрессирующих клонов с использованием пурамицина (2 мкг/мл). Эффективность трансдукции контролировали параллельной трансдукцией вектором, кодирующим GFP. Уровень гиперэкспрессии мРНК CBS оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с валидированными праймерами.

Стабильная гиперэкспрессия CBS подтверждена на уровне мРНК (qRT-PCR) для линий НЕК293Т, А549 и SH-SY5Y. В настоящий момент проводится валидация линий SK-N-SH и SKBR3, а также ведутся работы по получению стабильных популяций клеток НСТ116 и Н9с2.

Таким образом, создана панель стабильных клеточных линий с гиперэкспрессией CBS, представляющих различные тканевые и патологические контексты. Полученные линии являются ценной экспериментальной платформой для фундаментальных исследований роли CBS в клеточном метаболизме и патогенезе социально значимых заболеваний, а

также могут быть использованы для высокопроизводительного скрининга и валидации новых селективных терапевтических агентов, нацеленных на модуляцию активности этого фермента.